

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ВЕЩЕСТВ АМИНОКИСЛОТНОЙ, ПЕПТИДНОЙ И ПОЛИФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ *IN VITRO*

**Д.А. Фадеева, М.А. Халикова
Т.С. Полухина, О.О. Новиков
Е.Т. Жиликова, М.Ю. Новикова
Г.В. Васильев, Д.И. Писарев**

*Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

e-mail: fadееva_d@bsu.edu.ru

Изучена антиоксидантная активность карнозина, глутатиона, таурина, резвератрола в сравнении с кислотой аскорбиновой. Установлена высокая антиоксидантная активность резвератрола и глутатиона. Доказана возможность применения методики определения антиоксидантной активности для скрининговых исследований свойств антиоксидантов.

Ключевые слова: антиоксиданты, антиоксидантная активность, карнозин, глутатион, резвератрол.

Введение. В последние десятилетия ведутся активные исследования окислительного стресса в клетках и его патологического воздействия на организм. Активные формы кислорода (АФК), накапливаясь в клетках, нарушают их нормальный метаболизм и являются провокаторами окислительных повреждений макромолекул [3]. Наиболее эффективным способом нейтрализации АФК в клетке является использование антиоксидантов. Среди биологически активных веществ природного происхождения существует большое количество веществ различных классов, обладающих антиоксидантными свойствами. Большой интерес, на наш взгляд представляют вещества аминокислотной природы, как таурин, карнозин и глутатион, а также перспективный антиоксидант-полифенол резвератрол. Данные соединения, включаясь в многочисленные обменные реакции, могут оказывать как прямое, так и опосредованное антиоксидантное действие [2, 10]. Механизм действия данных соединений различен, однако доказано их положительное влияние на уменьшение окислительного стресса в клетках. По нашим данным, сравнительного изучения антиоксидантной активности этих соединений не проводилось.

Целью работы стало исследование антиоксидантной активности веществ аминокислотной, пептидной и полифенольной природы в сравнении с кислотой аскорбиновой. Выбор объектов исследования определен в связи с общей направленностью исследований научного коллектива в области разработки перспективных лекарственных составов для практической офтальмологии.

Исследованию антиоксидантной активности веществ посвящено достаточно большое количество работ [1, 7, 9]. Разработаны и успешно применяются методики *in vivo* и *in vitro* определения данной активности [4, 6, 8]. Однако большинство из этих методик достаточно дорогостоящи и длительны во времени, кроме того, предусматривают использование специфических реактивов. Известен способ определения антиоксидантной активности химическим способом, заключающийся во взаимодействии исследуемых веществ с раствором калия перманганата [5].

Материалы и методы. В качестве объектов исследования были выбраны водные растворы кислоты аскорбиновой, карнозина, глутатиона, таурина, резвератрола, водно-спиртовые растворы рутина и кверцетина, спиртовой раствор резвератрола.

Для определения антиоксидантной активности 0,05 Н раствор калия перманганата в 0,024 М растворе кислоты серной титруют растворами исследуемых веществ до обесцвечивания. В качестве косвенного показателя антиоксидантной активности (АОА, мг/мл) нами использовалось количество вещества в миллиграммах, пошедшее на обесцвечивание 1 мл раствора калия перманганата. Для лучшего представления результатов использовалась величина антиоксидантной способности (АОС), численно выражающаяся в значении, обратном АОА.

Результаты исследования и обсуждение. Исследование антиоксидантной активности осуществлялось в двух группах веществ: аминокислотной и пептидной

природы (таурин, глутатион, карнозин), а также полифенольной природы (резвератрол, рутин, кверцетин).

Для определения уровня антиоксидантной активности изучаемых веществ был использован раствор кислоты аскорбиновой, известного модельного антиоксиданта. При исследовании антиоксидантной активности веществ аминокислотной и пептидной природы использовали водные растворы таких соединений, как таурин, глутатион и карнозин. Результаты изучения их активности приведены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты исследования антиоксидантной активности таурина, карнозина и глутатиона

№ п/п	Вещества	АОА, мг/мл	$\Sigma(\overline{\text{АОА}} - \text{АОА}_i)^2$	$S_{\text{АОА}}$	$\Delta\text{АОА}$, мг/мл	ε , %	АОС
1.	Глутатион	0,350	$2,0 \cdot 10^{-7}$	$2,58 \cdot 10^{-3}$	$6,32 \cdot 10^{-3}$	1,80	2857
2.	Карнозин	51,700	$2,1 \cdot 10^{-4}$	$8,37 \cdot 10^{-2}$	0,21	0,39	19
3.	Таурин	-*	-	--	-	-	0
4.	Аскорбиновая кислота	0,280	$2,0 \cdot 10^{-9}$	$2,58 \cdot 10^{-4}$	$6,32 \cdot 10^{-4}$	0,23	3571

Примечание: * – не проявляет антиоксидантной активности.

Как видно из данных табл. 1, сопоставимой с действием кислоты аскорбиновой активностью обладает только глутатион, карнозин проявил очень низкую активность, таурин же не обесцвечивал раствор калия перманганата. Полученные результаты, свидетельствующие о низкой активности карнозина, подтверждают имеющиеся в литературе данные о низкой активности данного соединения *in vitro* [3].

В рамках изучения антиоксидантной активности полифенолов исследовали спиртовые растворы кверцетина, рутина и резвератрола. Однако в офтальмологической практике использовать в качестве растворителя спирт этиловый не представляется возможным. Поэтому для изучения антиоксидантной активности резвератрола был использован, кроме того, водный раствор солюбилизованного резвератрола (табл. 2).

Таблица 2

Результаты исследования антиоксидантной активности резвератрола, рутина, кверцетина

№ п/п	Вещества	АОА, мг/мл	$\Sigma(\overline{\text{АОА}} - \text{АОА}_i)^2$	$S_{\text{АОА}}$	$\Delta\text{АОА}$, мг/мл	ε , %	АОС
1	Аскорбиновая кислота	0,280	$2,0 \cdot 10^{-9}$	$2,58 \cdot 10^{-4}$	$6,32 \cdot 10^{-4}$	0,23	3571
2	Рутин	0,936	$6,4 \cdot 10^{-8}$	$1,46 \cdot 10^{-3}$	$3,57 \cdot 10^{-3}$	0,38	1068
3	Кверцетин	0,096	$6,4 \cdot 10^{-8}$	$1,45 \cdot 10^{-3}$	$3,57 \cdot 10^{-3}$	3,72	10417
4	Резвератрол (спиртовой раствор)	0,056	$8,0 \cdot 10^{-9}$	$5,16 \cdot 10^{-3}$	$1,26 \cdot 10^{-3}$	2,25	17857
5	Резвератрол (солюбилизованный в воде)	0,063	$2,8 \cdot 10^{-9}$	$3,06 \cdot 10^{-4}$	$7,49 \cdot 10^{-4}$	1,18	15923

Результаты исследований показали высокую антиоксидантную активность резвератрола как в спиртовом, так и в водном растворе, а также кверцетина. Данные соединения проявили большую антиоксидантную активность, нежели кислота аскорбиновая, что подтверждает литературные данные [7, 11].

Таким образом, доказана применимость методики [5] для скрининговых исследований по изучению антиоксидантной активности природных соединений. Однако использование данной методики не исключает дальнейших экспериментов *in vivo* для



веществ, обладающих наибольшей антиоксидантной активностью (по результатам опытов *in vitro*).

Полученные результаты позволили отобрать наиболее перспективные антиоксиданты — глутатион, резвератрол, карнозин. Их дальнейшее изучение *in vivo* позволит получить более полные научные данные. Это особенно важно для карнозина, так как существует мнение, что данное соединение *in vivo* активирует дополнительные процессы, усиливающие его антиоксидантное действие [3].

Полученные результаты планируется использовать для обоснования выбора действующих веществ при создании новых лекарственных препаратов.

Работа выполнена в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 гг., Государственный контракт № 14.740.11.0119 от 8 сентября 2010 г, тема исследования «Комплексные фармакологические и технологические исследования ряда субмикроструктурированных (наноструктурированных) фармацевтических субстанций с доказанными измененными физико-химическими свойствами».

Литература

1. Абдуллин, И. Ф. Применение электрогенерированного брома для оценки интегральной антиоксидантной способности лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе/ И.Ф.Абдуллин, Е.Н.Турова, Г.Х.Гайсина и др.// Ж. аналит. химии. – 2002. – Т.57, №6. – С.666-670.
2. Болдырев, А. А. Проблемы и перспективы исследования биологической роли карнозина/ А.А. Болдырев // Биохимия. – Т. 65, №. 7. – 2000. – С. 884-890.
3. Болдырев, А.А. Карнозин: эндогенный физиологический корректор активности антиоксидантной системы организма / А.А. Болдырев, С.Л. Стволинский, Т.Н. Федорова // Усп. физиол. наук. – 2007. – № 38(3). – С.57-71.
4. Макарова, М. Н. Изучение антирадикальной активности индивидуальных флавоноидов и их комбинаций с другими антиоксидантами в опытах *in vitro* / М.Н. Макарова, В.Г.Макаров, И.Г. Зенкевич // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения : материалы VII Международного съезда Фитофарм 2003, СПб.–Пушкин. – 3-5 июля 2003 г. – СПб., 2003. – С.216-222.
5. Пат. 2170930 Российская Федерация, МПК G 01 N 33/50, G 01 N 33/52. Способ определения антиокислительной активности [Текст] / Максимова Т.В. и др.; заявитель и патентообладатель Моск. медицинская академия им.И.М.Сеченова. – № 2000111126/14 ; заявл. 05.05.00 ; опубл. 20.07.01.- Интернет-ресурс www.fips.ru.
6. Подосиновичева, Н. П. *Daphnia magna* Straus — новая модель для изучения антиоксидантного действия водорастворимых препаратов в эксперименте *in vivo* / Н.П. Подосиновичева, В.В.Петров, В.Б. Долго-Сабуров // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2005. – Т.68, №3. – С.68-73.
7. Цюпко, Т. Г. Разработка методического подхода к определению антиоксидантной активности пищевых продуктов и лекарственного сырья / Т.Г.Цюпко, З.А.Темердашев, О.Б.Воронова и др.// Наука Кубани. – 2004. – №3 – С. 89-91.
8. Antolovich, M. Methods for testing antioxidant activity / M. Antolovich, P.D.Prenzler, E.Mc Donald et al.// Analyst. – 2002. – Vol.127. – P. 183-198.
9. Korotkova, E. I. Study of antioxidant properties by voltammetry / E.I.Korotkova, Y.A.Karbainov, A.V. Shevchuk //J. Electroanalytical chem. – 2002.- Vol.518, №1.- P.56-60.
10. de la Lastra, C.A. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications / C.A. de la Lastra, I.Villegas // Biochem. Soc. Trans. – 2007. – Oct.; Vol. 35 (Pt 5). – P. 1156-1160.
11. Soares, D.G. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamin C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems/ D.G.Soaes, A.C.Andreazza, M.Salvador // J. Agric. Food Chem. – 2003. – Vol.51(4). – P.1077–1080.



ESTIMATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SOME AMINOACIDS, PEPTIDES AND POLYPHENOLS *IN VITRO*

**D.A. Fadeeva, M.A. Khalikova
T.S. Polukhina, O.O. Novikov
E.T. Zhilyakova, M.Yu. Novikova
D.I. Pisarev, G.V. Vasiliev**

Belgorod National Research University

e-mail: fadeeva_d@bsu.edu.ru

Antioxidant activity of carnosine, taurine, glutathione, resveratrol was studied in comparison with activity of ascorbic acid. It was estimated that resveratrol and glutathione possess high antioxidant ability. The possibility of using the method of estimation of antioxidant activity in screening tests was proved.

Key words: Antioxidants, antioxidant activity, carnosine, glutathione, resveratrol.